

# 长链非编码 RNANKILA 在颈动脉狭窄中的临床价值及生物学机制研究

余春 邵思琪

景德镇市第三人民医院 神经内科 江西景德镇 333000

课题类别：江西省卫生健康委科技计划

项目编号：SKJP220226109

**【摘要】**目的：研究长链非编码 RNANKILA 在颈动脉狭窄（CAS）中的临床价值及生物学机制。方法：纳入我院 2019 年 1 月至 2021 年 5 月期间收治的 80 例无症状 CAS 患者，纳入研究组，选择同期于我院接受健康体检的 80 例年龄在 50-80 岁之间的健康受检者纳入对照组。均进行 NKILA 表达水平检测，同时通过 CCK-8 检测细胞增殖，Transwell 小室实验检测细胞迁移，测定炎症因子水平，并通过 Western blot 检测蛋白水平。结果：研究组血浆 NKILA 的相对表达量低于对照组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。ROC 曲线分析显示，血浆 NKILA 表达水平诊断颈动脉狭窄的曲线下面积（AUC）为 0.842。NKILA 过表达时，增殖能力高于 NKILA 沉默，迁移细胞数少于 NKILA 沉默，TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平低于 NKILA 沉默，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。Western blot 结果显示，NKILA 过表达 VSMCs 中 p-I $\kappa$ B  $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著降低，胞浆中 p65 蛋白表达水平显著升高，NKILA 沉默则呈现相反趋势，p-I $\kappa$ B  $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著升高，而胞浆中 p65 蛋白表达水平显著降低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），提示 NKILA 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 VSMCs 功能。结论：NKILA 在颈动脉狭窄患者血浆中的表达水平显著降低，具有较高的潜在诊断价值。NKILA 能够抑制血管平滑肌细胞的增殖、迁移和炎症因子分泌，并抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活，调控血管平滑肌细胞功能。

**【关键词】**颈动脉狭窄；长链非编码 RNA；NKILA；生物学机制

颈动脉粥样硬化性狭窄即颈部大动脉血管管壁变窄，颈动脉狭窄（carotid artery stenosis, CAS）疾病本身不具有死亡风险，但因颈动脉狭窄诱发的缺血性疾病，会对人体造成较大的死亡威胁<sup>[1]</sup>。伴随颈动脉狭窄程度的增加，脑卒中的发病风险也逐步增加<sup>[2]</sup>。颈动脉狭窄的发病机制与血管平滑肌细胞异常增殖、迁移及炎症反应等多种因素密切相关<sup>[3]</sup>。长链非编码 RNA NKILA（NF- $\kappa$ B Interacting LncRNA）是一类位于染色体 20q13 的重要非编码 RNA 分子，主要通过特异性调控 NF- $\kappa$ B 信号通路，进行多种心血管疾病病理生理过程的参与。研究表明，NKILA 能够通过物理遮挡 I $\kappa$ B 的磷酸化位点，抑制 IKK 对 I $\kappa$ B 的磷酸化一剂 NF- $\kappa$ B 通路的激活，实现炎症反应调控。在颈动脉狭窄的进展过程中，NF- $\kappa$ B 信号通路的异常激活会导致血管平滑肌细胞表型转换，从收缩型转变为合成型，进而表现出增强的增殖、迁移和分泌能力，促进动脉粥样硬化斑块形成和血管重塑。本研究结合部分临床资料，就 NKILA 在颈动脉狭窄中的表达变化及其临床价值进行探索，分析其生物学机制，为颈动脉狭窄的早期诊断与干预提供部分思路。

## 1 资料与方法

1.1、一般资料：纳入我院 2019 年 1 月至 2021 年 5 月期间收治的 80 例无症状 CAS 患者，纳

入标准：年龄在 50-80 岁之间；根据患者临床数据和美国国立卫生研究院卒中量表确定为无症状 CAS；通过彩色多普勒超声确诊颈动脉狭窄程度 $\geq 50\%$ 。排除标准：既往中风病史；既往短暂性脑缺血发作者；伴冠状动脉不稳定；伴充血性心力衰竭；合并慢性或急性炎症；确诊癌症者；近期颅内出血者；伴吸烟饮酒史。纳入研究组，选择同期于我院接受健康体检的 80 例年龄在 50-80 岁之间的健康受检者纳入对照组。研究组中男性 45 例，女性 35 例，年龄 50~80 (66.59 $\pm$ 6.52) 岁，对照组中男性 42 例，女性 38 例，年龄 50~80 (67.23 $\pm$ 7.13) 岁，两组性别、年龄等一般资料对比无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

## 1.2、方法

1.2.1、样本采集与处理：于患者入院当天采集血样，室温下 2500r/min 离心处理 15min，收集血清样品，并在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.2.2、NKILA 表达水平检测：采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测受试者血清的 NKILA 水平。通过 TRIzol 试剂提取总 RNA，NanoDrop 测定 RNA 浓度和纯度，A260/A280 比值在 1.8-2.0 之间。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，以 GAPDH 为内参基因，采用 SYBR Green 法进行 qRT-PCR 检测。NKILA 引物序列：上游 5'-CAGGTCAAGGTCAGGTCAAG-3'，下游 5'-TGGTCACAGTCTGGTCACAG-3'；GAPDH 引物序列：上游 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'，下游 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5min；95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30s，60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30s，72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30s，共 40 个循环。在此基础上，通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 NKILA 的相对表达量。

1.2.3、细胞培养和转染：VSMC 购自美国典型培养物保藏中心，并在含有 10% 胎牛血清 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) 中培养。将细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。当细胞达到 60% 融合度时进行细胞转染。

1.2.4、CCK-8 检测细胞增殖：将转染后指数生长期的 VSMC 以每孔  $5\times 10^4$  个细胞接种在 96 孔板中连续培养 3 天，并在 0、24、48 或 72 小时测定其增殖能力。检测前，每孔加入 10  $\mu\text{l}$  Cell Counting kit 8 (CCK-8) 试剂，继续孵育 1 h。通过 Bio-Rad iMark 读板器在 490 nm 处检测吸光度值。

1.2.5、Transwell 小室实验检测细胞迁移：使用 8  $\mu\text{m}$  孔径(美国康宁公司)的 Transwell 小室测试 VSMCs 的迁移能力。转染后的细胞在无血清培养基中制备成细胞悬液，在 Transwell 室的上腔接种  $\times 10^4$  个细胞/孔，下腔加入 500  $\mu\text{l}$  含 10% 胎牛血清的培养基。在培养箱中培养 24 h，用棉签擦拭上腔未迁移的细胞，4% 多聚甲醛固定 10 min，结晶紫染色 20 min。在显微镜下随机选取 5 个视野进行计数，检测 VSMCs 迁移能力的变化。

1.2.6、炎症因子水平测定：采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白介素-6 (IL-6) 的水平。

1.2.7、Western blot 检测蛋白水平：4 $^{\circ}\text{C}$  下加入 RIPA 试剂裂解 60 分钟。离心收集上清裂解液，BCA 蛋白测定测定浓度。取 25 微克蛋白在 80 V 下电泳 120 min，然后将蛋白在 90 V 下转移到 PVDF 膜上 100 min，封闭 2 h 后在 4 $^{\circ}\text{C}$  下与一抗孵育过夜。用 TBST 溶液冲洗膜 3 次，10 分钟，与辣根过氧化物偶联二抗 (山羊抗小鼠 IgG, 1:2000, Proteintech; 山羊抗兔 IgG, 1:2000, Proteintech) 室温孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次后，用化学发光检测试剂盒对蛋白条带进行可视化，用 Image J 软件对其光密度进行定量。

1.2.8、随访结果收集：对所有 CAS 患者及健康对照组人员进行 5 年随访。

## 1.3、统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 统计学软件处理，计量资料用 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，采用 t 检验，计数资

料用[n(%)]表示,采用 $\chi^2$ 检验,采用 ROC 曲线评估 NKILA 对颈动脉狭窄的诊断价值,  $P < 0.05$  说明差异存在统计学意义。

## 2 结果

2.1、两组 NKILA 表达情况对比及 NKILA 在 CAS 中的诊断价值: 对照组血浆 NKILA 的相对表达量为  $(1.01 \pm 0.21)$ , 研究组为  $(0.52 \pm 0.18)$ , 研究组血浆 NKILA 的相对表达量低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。ROC 曲线分析显示, 血浆 NKILA 表达水平诊断颈动脉狭窄的曲线下面积(AUC)为  $0.842(95\%CI: 0.782-0.902)$ , 最佳截断值为  $0.681$  时, 敏感度为  $78.32\%$ , 特异度为  $85.04\%$ 。

2.2、NKILA 对 VSMCs 功能、VSMCs 炎症因子分泌的影响: NKILA 过表达时, 增殖能力高于 NKILA 沉默, 迁移细胞数少于 NKILA 沉默, TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平低于 NKILA 沉默, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 NKILA 对 VSMCs 功能、VSMCs 炎症因子分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

NKILA 表达情况	例数	增殖能力 (OD490nm, 72h)	迁移细胞数(个 /视野)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
NKILA 过表达	42	$0.62 \pm 0.07$	$42.31 \pm 5.66$	$65.43 \pm 8.25$	$52.62 \pm 6.83$
NKILA 沉默	38	$1.28 \pm 0.13$	$105.72 \pm 11.33$	$186.17 \pm 21.39$	$152.45 \pm 18.64$
t		28.643	32.124	33.918	32.405
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3、NKILA 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 VSMCs 功能的机制分析: Western blot 结果显示, NKILA 过表达 VSMCs 中 p-I $\kappa$ B $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著降低, 胞浆中 p65 蛋白表达水平显著升高, NKILA 沉默则呈现相反趋势, p-I $\kappa$ B $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著升高, 而胞浆中 p65 蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 NKILA 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 VSMCs 功能。见表 2。

表 2 NKILA 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控 VSMCs 功能的机制分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

NKILA 表达情况	例数	胞浆 p65	核内 p65	I $\kappa$ B $\alpha$	p-I $\kappa$ B $\alpha$
NKILA 过表达	42	$1.35 \pm 0.14$	$0.42 \pm 0.05$	$1.28 \pm 0.13$	$0.38 \pm 0.04$
NKILA 沉默	38	$0.65 \pm 0.07$	$1.56 \pm 0.16$	$0.72 \pm 0.08$	$1.48 \pm 0.15$
t		27.824	43.893	22.911	45.788
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 3 讨论

颈动脉狭窄的发生与动脉粥样硬化密切相关, 研究发现, 血管平滑肌细胞的异常增殖与迁移是颈动脉狭窄发生发展的关键。正常生理状态下, 血管平滑肌细胞维持血管张力与结构的稳定性, 而受到病理因素影响, 会发生表型转换, 从收缩型转变为合成型, 进而出现增强的增殖、迁移和分泌能力, 促进动脉粥样硬化斑块形成及血管重塑。NF- $\kappa$ B 通常以二聚体形式存在, 静息状态下会与抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合形成复合物, 以非活性形式存在于细胞质中。但受到刺激时, 如促炎细胞因子等, I $\kappa$ B 激酶复合物被激活, 会导致 I $\kappa$ B 磷酸化并被蛋白酶降解, 促使 NF- $\kappa$ B 转位至细胞核, 进而与特定的 DNA 序列结合<sup>[4]</sup>。

本研究分析了长链非编码 RNANKILA 在颈动脉狭窄中的临床价值及生物学机制, 发现研

究组血浆 NKILA 的相对表达量低于对照组,提示 NKILA 可作为颈动脉狭窄的诊断和预后评估生物标志物。ROC 曲线分析显示,血浆 NKILA 表达水平诊断颈动脉狭窄的 AUC 为 0.842,具有较高的诊断价值。同时本研究发现,NKILA 过表达时,增殖能力高于 NKILA 沉默,迁移细胞数少于 NKILA 沉默,TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平低于 NKILA 沉默,提示 NKILA 通过抑制血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移,减轻炎症反应,从而在颈动脉狭窄的发生发展中发挥保护作用。在颈动脉狭窄过程中,NF- $\kappa$ B 信号通路的激活可诱导多种促炎症细胞因子的产生,如 IL-6 和 TNF- $\alpha$ ,这些因子与动脉粥样硬化炎症、内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞增殖等过程密切相关。

Western blot 结果显示,NKILA 过表达 VSMCs 中 p-I $\kappa$ B $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著降低,胞浆中 p65 蛋白表达水平显著升高,NKILA 沉默则呈现相反趋势,p-I $\kappa$ B $\alpha$  和核内 p65 蛋白表达水平显著升高,而胞浆中 p65 蛋白表达水平显著降低,证实了 NKILA 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控血管平滑肌细胞功能。NKILA 具有保守的二级结构,能够在细胞质中与 NF- $\kappa$ B 信号通路的关键蛋白直接相互作用,尤其是与 p65/I $\kappa$ B 复合物结合,通过物理遮挡 I $\kappa$ B 的磷酸化位点,从而抑制 IKK 对 I $\kappa$ B 的磷酸化及 NF- $\kappa$ B 通路的激活<sup>[5]</sup>。

综上所述,在颈动脉狭窄患者血浆中 NKILA 表达水平显著降低,且与疾病严重程度相关,具有较高的潜在诊断价值。NKILA 能够抑制血管平滑肌细胞的增殖、迁移和炎症因子分泌,同时通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,调控血管平滑肌细胞功能。

#### 参考文献

- [1]张田,黄炎. 颈动脉超声对脑梗死患者颈动脉斑块及其血流参数与 Hcy 联合应用于颈动脉狭窄程度的诊断价值研究[J].黑龙江医药科学,2026,49 (5):179-181+184.
- [2]张萌,刘彦汝. 外翻式与经典式颈动脉内膜剥脱术治疗颈动脉狭窄的预后研究[J].中国现代药物应用,2026,20 (11):42-45.
- [3]Jiang Y ,Zhang N ,Huang T , et al. Serum miR-15b-3p as a Potential Diagnostic Biomarker for Carotid Artery Stenosis[J].Artery Research,2026,32 (1):9-9.
- [4]Dayong S ,Qiang C ,Jianchao L , et al. Clinical Value of Long Non-Coding RNA HOTAIR in Carotid Artery Stenosis and Its Role in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation[J].Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression,2022,33 (1):15-23.
- [5]Gang L ,Xun H ,Yi L , et al. Circulating long non-coding RNA Coromarker expression correlated with inflammation, coronary artery stenosis, and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease.[J].Journal of clinical laboratory analysis,2022,36 (11):e24716-e24716.